

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



GP1611

PATENT
Atty. Docket No. FJN-060DV
(3999/63)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

#3 / 7.2

07/22/98

APPLICANT(S): Masaaki Goto et al.

SERIAL NUMBER: 09/062,113 GROUP NUMBER:

FILING DATE: April 17, 1998 EXAMINER:

TITLE: NOVEL PROTEINS AND METHODS FOR PRODUCING THE
PROTEINS

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service via first-class mail, postage prepaid, in an envelope addressed to: Assistant Commissioner for Patents, Washington D.C., 20231 on May 22, 1996.

Date: May 11, 1998

Paula M. Swirka

TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPIES

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Attached please find the certified copies of the foreign applications from which priority is claimed for this case:

Country: Japan
Application Number: 054977/1995
Filing Date: February 20, 1995

Country: Japan
Application Number: 207508/1995
Filing Date: July 21, 1995

RECEIVED

JUL 14 1998

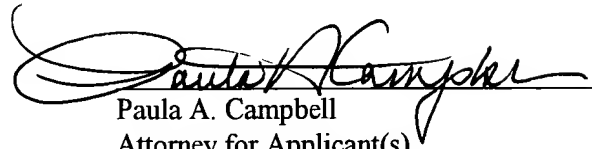
MAIL ROOM
SERVICE CENTER

Country: PCT
Application Number: PCT/JP96/00374
Filing Date: February 20, 1996.

Respectfully submitted,

Date: May 11, 1998
Reg. No. 32,503

Tel. No. (617) 248-7263
Fax: (617) 248-7100

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Paula A. Campbell", written over a horizontal line.

Paula A. Campbell
Attorney for Applicant(s)
Testa, Hurwitz, & Thibault, LLP
High Street Tower
125 High Street
Boston, Massachusetts 02110

188PAC3999/63.518489



日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1995年 2月20日

出願番号

Application Number:

平成 7年特許願第054977号

出願人

Applicant (s):

雪印乳業株式会社

RECEIVED

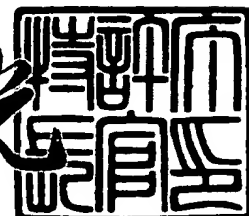
JUL 14 1998

MAIL ROOM
SERVICE CENTER

1998年 4月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3025015

【書類名】 特許願

【整理番号】 SNMFP95223

【提出日】 平成 7年 2月20日

【あて先】 特許庁長官 高島 章 殿

【発明の名称】 新規蛋白質及びその製造方法

【請求項の数】 4

【発明者】

 【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1

 【氏名】 後藤 雅昭

【発明者】

 【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋622 マロニエハイツ201

 【氏名】 津田 英資

【発明者】

 【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑5-22-6

 【氏名】 望月 伸一

【発明者】

 【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ3-1

 【氏名】 矢野 和樹

【発明者】

 【住所又は居所】 栃木県河内郡河内町下岡本3777-4

 【氏名】 小林 文枝

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県川越市今福1672-1 メゾンむさし野719

 【氏名】 上田 正次

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県川越市山田1769-10

 【氏名】 東尾 侃二



【特許出願人】

【識別番号】 000006699
【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社
【代表者】 片山 純男

【代理人】

【識別番号】 100090941
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤野 清也
【電話番号】 3226-6671

【代理人】

【識別番号】 100105061
【弁理士】
【氏名又は名称】 児玉 喜博
【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

【納付方法】 予納
【予納台帳番号】 014834
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 9406430



【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規蛋白質及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60 kD (還元条件下)、約60 kD及び約120 kD (非還元条件下)

(b) 親和性 ; 陽イオン交換体、シバクロンブルーゲル及びヘパリンに親和性を有する。

(c) 熱安定性 ; 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

(d) アミノ酸配列 ; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1及び配列番号2のアミノ酸配列をもつ。

【請求項2】 ヒト線維芽細胞が産生する、請求項1記載の蛋白質。

【請求項3】 ヒト線維芽細胞を細胞培養し、培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、シバクロンブルーカラム及び逆相カラムへの吸着及び溶出を行なって精製することを特徴とする請求項1または2記載の蛋白質の製造法。

【請求項4】 アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なう請求項3記載の蛋白質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、破骨細胞の分化及び／又は成熟を抑制する活性を示す新規な蛋白質、即ち破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclast Inhibitory Factor ; OCIF) 及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来技術】

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きを



している細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される。

【0003】

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー（fibroblast growth factor ; FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987）、インシュリン様増殖因子-I (insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J. M. et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988)、インシュリン様増殖因子-II (IGF-II: McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989)、アクチビンA (Activin A ; Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991)、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988)、バスキュロトロピン (Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 199, p380, 1994)、及び異所骨形成因子ファミリー (bone morphogenic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682, 1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992, Knutsen R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.194, p1352, 1993) 等のサイトカインが報告されている。

【0004】

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988) やインターロイキン-4 (interleukin-4 ; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993) 等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin ; Bone-Miner., vol.17, p347, 1992) 、マクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J.Cell. Physiol. vol.137, p199, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- γ (interferon- γ ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986) 等が報告されている。

【0005】

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や 異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD₃、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イプリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。前述したように、骨代謝は骨形成と骨吸収のバランスによって調節されており、破骨細胞の分化・成熟を抑制するサイトカインは、骨粗鬆症等の骨量減少症の治療薬となることが期待される。従って、本発明は新規な破骨細胞形成抑制因子及びその効率的



な製造方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、このような現状に鑑み鋭意探索の結果、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90(ATCC寄託-受託番号CCL186)の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性を有する蛋白質OCIFを見出すに至った。

また、細胞培養の担体としてアルミナセラミック片を使用すると本発明の破骨細胞形成抑制因子OCIFを培地中に高濃度に蓄積せしめ、効率よく精製できることを見出した。

さらに、本発明者らは、前記培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、シバクロンブルーカラム及び逆相カラムで順次処理して吸着及び溶出をくり返すことによって前記蛋白質OCIFを効率よく精製する方法を確立した。

【0008】

本発明は、ヒト胎児肺線維芽細胞に由来し、還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kD、非還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kD又は約120kDであり、陽イオン交換体、シバクロンブルーカラム及びヘパリンカラムに親和性を有し、70℃、10分間又は56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性が低下し、90℃10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われることを特徴とする蛋白質に関する。本発明の蛋白質OCIFの構造は、既知の破骨細胞形成抑制因子とは明確に相違する。

さらに本発明は、ヒト線維芽細胞を培養し、培養液をヘパリンカラム処理し、吸着画分を溶出し、溶出液を陰イオン交換カラム処理して非吸着画分を得て、この画分を陽イオン交換カラムにかけ吸着・溶出し、さらにヘパリンカラム、シバクロンブルーカラム、逆相カラムによって精製して前記蛋白質を採取する、蛋白質OCIFの製造方法に関する。本発明におけるカラム処理は、単に培養液等をヘパリンセファロースカラム等に流下させるものばかりではなく、バッチ法で培養液をヘパリンセファロース等と混合し、カラム処理した場合と同等の効果を奏



するものも包含する。又、本発明で使用するシバクロンブルーカラムの充填剤は、セファロース（セルロース）を担体とし色素シバクロンブルー F 3 G A を結合させたものであり、このカラムは通常ブルーカラムと呼ばれる。

さらに、本発明は、アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なって効率よく前記蛋白質を製造する方法に関する。

【0009】

本発明蛋白質 O C I F は、ヒト線維芽細胞の培養液から効率良く且つ高収率で単離精製することができる。この原料からの本発明蛋白質 O C I F の製造は、生体物質からの蛋白性物質の分離に汎用される通常の方法と同様にして、目的とする蛋白質 O C I F の物理的、化学的性質を利用した各種の精製操作に従い実施することができる。この濃縮手段として限外濾過、凍結乾燥、及び塩析等の通常の生化学的処理手段が挙げられる。又、精製手段としては、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、調製用電気泳動等を用いた通常の蛋白性物質の精製に利用される各種の手法を組み合わせる用いることができる。特に好ましくは、ヒト線維芽細胞としてヒト胎児肺線維細胞 I M R - 9 0 (A T C C - C C L 1 8 6) を用いることが望ましい。そして原料となるヒト胎児肺線維芽細胞 I M R - 9 0 の培養は、ヒト胎児肺線維芽細胞 I M R - 9 0 をアルミナセラミック片に吸着させ、5%ウシ新生児血清を添加した D M E M 培地 (G i b c o 社製) を培養液として用い、ローラーボトル中で一週間から 10 日程度静置培養することにより得たものを使用するとよい。又、精製処理を実施する際に界面活性剤として 0.1% C H A P S (3 - [(3 - c h o l a m i d o p r o p y l) - d i m e t h y l a m m o n i o] - 1 - p r o p a n e s u l f o n a t e ; シグマ社製) を添加して精製を行うのが望ましい。

【0010】

本発明の蛋白質 O C I F の精製方法は、先ず培養液をヘパリンカラム（ヘパリン-セファロース C L - 6 B 、ファルマシア社製）にかけ、2 M N a C l を含む 10 m M T r i s - H C l 緩衝液、pH 7.5 で溶出させ、ヘパリン吸着性の O C I F 画分を得、この画分を Q ・ 陰イオン交換カラム (H i L o a d - Q /



FF、ファルマシア社製) にか、その非吸着画分を集めることにより、ヘパリン吸着性で塩基性のOCIF画分を得ることができる。得られたOCIF活性画分はS・陽イオン交換カラム(Hi Load-S/HP、ファルマシア社製)、ヘパリンカラム(ヘパリン-5PW、トーソー社製)、シバクロンブルーカラム(ブルー-5PW、トーソー社製)、逆相カラム(BU-300C4、アプライド社製)にかけることにより単離・精製することができ、この物質は前述した性質によって特定される。又、OCIF活性は、久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・酵素, Vol.34, p999 (1989)) 及びTakahashi N. et al. の方法(Endocrinology, Vol.122, p1373 (1988)) に従い測定した。即ち、生後約17日のマウス骨髄細胞を標的細胞として用い、活性型ビタミンD₃(Calcitriol) 存在下での破骨細胞の形成抑制を、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導の抑制で試験することにより測定した。

【0011】

本発明の蛋白質である破骨細胞形成抑制因子は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒトに対して安全に投与されるものである。

医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導體、及びその他の有機/無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤/賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤/賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができる。

【0012】

【実施例】



以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。しかしこれらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

ヒト線維芽細胞 IMR-90 培養液の調製

ヒト胎児肺線維芽細胞 IMR-90 (ATCC-CCL186) は、ローラーボトル (490 cm^2 , $110 \times 171\text{ mm}$ 、コーニング社製) 中で 80 g のアルミナセラミック片 (アルミナ 99.5% 、東芝セラミック社製) に付着させ培養した。培養には 60 個のローラーボトルを使用し、ローラーボトル 1 個当たり 5% 子牛血清を添加した 500 ml の 10 mM HEPES 緩衝液添加 DMEM 培地 (ギブコ社製) を用い、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で $7 \sim 10$ 日間静置培養した。培養後培養液を回収し、新たな培地を添加することにより 1 回の培養で 301 の IMR-90 培養液を得た。得られた培養液を試料 1 とした。

【0013】

破骨細胞形成抑制活性の測定法

本発明の蛋白性破骨細胞形成抑制因子の活性測定は久米川正好らの方法 (蛋白質・核酸・酵素 Vol.34 p999(1989)) 及び Takahashi N. et.al の方法 (Endocrinology vol.122 p1373 (1988)) に従い測定した。即ち、生後約 17 日のマウス骨髄細胞からの活性型ビタミン D_3 存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定することによって行った。即ち、 96 ウェルマイクロプレートに $2 \times 10^{-8}\text{ M}$ 活性型ビタミン D_3 及び 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地 (ギブコ社製) で希釈したサンプル $100\text{ }\mu\text{l}$ を入れ、生後約 17 日のマウス骨髄細胞 3×10^5 個を $100\text{ }\mu\text{l}$ の 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地に懸濁させて播種し、 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 、湿度 100% にて一週間培養した。培養 3 日目と 5 日目に、培養液 $160\text{ }\mu\text{l}$ を廃棄し、 $1 \times 10^{-8}\text{ M}$ 活性型ビタミン D_3 及び 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地で希釈したサンプル $160\text{ }\mu\text{l}$ を添加した。培養 7 日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン ($1:1$) 溶液で細胞を室温にて 1 分間固定し、破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性測定キット (Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログ No 387-A, シグマ社製) を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少を OCIF

活性とした。

【0014】

OCIFの精製

i) ヘパリン・セファロースCL-6Bによる精製

約90lのIMR-90培養液(試料1)を、 $0.22\mu\text{m}$ のフィルター(親水性ミリディスク、 $2,000\text{cm}^2$ 、ミリポア社製)で濾過した後、3回に分けて 0.3M NaCl を含む 10mM Tris-HCl 緩衝液(以下、 Tris-HCl という)、 $\text{pH}7.5$ で平衡化させた80mlのヘパリン・セファロースCL-6B($5\times 4.1\text{cm}$)にかけた。流速 500ml/hr にて、 10mM Tris-HCl 、 $\text{pH}7.5$ で洗浄した後、 10mM Tris-HCl / 2M NaCl 、 $\text{pH}7.5$ で溶出を行い、ヘパリン・セファロースCL-6B吸着画分900mlを得、得られた画分を試料2とした。

【0015】

ii) HiLoad-Q/FFによる精製

ヘパリン・セファロース吸着画分(試料2)を 10mM Tris-HCl 、 $\text{pH}7.5$ に対して透析した後、 0.1% になるようにCHAPSを加え 4°C で一晩放置したものを、2回に分けて 50mM Tris-HCl 、 0.1% CHAPS、 $\text{pH}7.5$ で平衡化した陰イオン交換カラム(HiLoad-Q/FF、 $2.6\times 10\text{cm}$ 、ファルマシア社製)にかけ、非吸着画分1000mlを得た。得られた画分を試料3とした。

【0016】

iii) HiLoad-S/HPによる精製

HiLoad-Q非吸着画分(試料3)を、 50mM Tris-HCl / 0.1% CHAPS、 $\text{pH}7.5$ で平衡化した陽イオン交換カラム(HiLoad-S/HP、 $2.6\times 10\text{cm}$ 、ファルマシア社製)にかけた。 50mM Tris-HCl / 0.1% CHAPS、 $\text{pH}7.5$ で洗浄した後、100分間で NaCl を 1M にする直線勾配、流速 8ml/分 にて溶出を行い、 12ml/フラクション にて分取を行った。フラクション1~40を10フラクションづつ4つの画分にまとめ、それぞれ $100\mu\text{l}$ を用いてOCIF活性を測定した。OCIF活



性はフラクション11~30に認められた(図1)。より比活性の高いフラクション21~30を試料4とした。

【0017】

iv) アフィニティーカラム(ヘパリン-5PW)による精製

120mlの試料4を240mlの50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で希釈した後、50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で平衡化したアフィニティーカラム(ヘパリン-5PW、0.8×7.5cm、トーソー社製)にかけた。50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0.5ml/分にて溶出を行い、0.5ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション50μlを用いてOCIF活性を測定し、約0.7~1.3M NaClで溶出されるOCIF活性画分10mlを得、試料5とした。

【0018】

v) アフィニティーカラム(ブルー-5PW)による精製

10mlの試料5を190mlの50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で希釈した後、50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で平衡化したアフィニティーカラム(ブルー-5PW、0.8×7.5cm、トーソー社製)にかけた。50mM Tris-HCl/0.1%CHAPS, pH7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0.5ml/分にて溶出を行い、0.5ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション25μlを用いてOCIF活性を測定し、約1.0~1.6M NaClで溶出されるOCIF活性フラクション49~70を得た(図2)。

。

【0019】

vi) 逆相カラムによる精製

得られたフラクション49~50各1mlに、10μlの25%TFA(トリフルオロ酢酸)を加えた後、25%アセトニトリル/0.1%TFAで平衡化した逆相カラム(BU-300, C4, 2.1×220mm、アプライド社製)にかけ、60分間でアセトニトリルを55%にする直線勾配、流速0.2ml/分にて



溶出を行い、各ピークを分取した（図3）。各ピークフラクションの100 μ lを用いてOCIF活性を測定し、ピーク6及びピーク7に濃度依存的に活性を検出した。結果を表1に示す。

【0020】

【表1】

逆相カラムから溶出されたOCIF活性

希釈率	1/40	1/120	1/360	1/1080
ピーク13	++	++	+	-
ピーク14	++	+	-	-

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

【0021】

OCIFの分子量測定

OCIF活性の認められたピーク6及びピーク7各40 μ lを用い、還元条件下と非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。即ち、各ピークフラクション20 μ lづつを2本のチューブに分取し遠心濃縮した後、1. 5 μ lの10 mM Tris-HCl, pH 8/1 mM EDTA/2. 5% SDS/0. 01% ブロモフェノールブルー/±5% 2-メルカプトエタノールで溶解して37℃で一晩放置後、1 μ lをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のサンプルとした。電気泳動は10-15%アクリルアミドのグラジエントゲル（ファルマシア社製）を使用し、電気泳動装置Phast System（ファルマシア社製）を用いて行った。分子量マーカーとして、ホスホリラーゼb（94 kD）、ウシ血清アルブミン（67 kD）、オボアルブミン（43 kD）、カルボニックアンヒドラーゼ（30 kD）、トリプシンインヒビター（20. 1 kD）、 α -ラクトアルブミン（14. 4 kD）を用いた。電気泳動終了後、Phast Gel Silver Stain Kit（ファルマシア社製）を用いて銀染色を行った。結果を図



4に示す。

【0022】

その結果、ピーク6については還元条件下、非還元条件下で約60kDの蛋白質のバンドが検出された。又、ピーク7については、還元条件下で約60kD、非還元条件下で約120kDの蛋白質のバンドが検出された。従って、ピーク7はピーク6の蛋白質のホモダイマーであると考えられる。

【0023】

OCIFの熱安定性試験

ブルー5PWフラクション51～52を混合したサンプル20 μ lにつき70℃及び90℃にて10分間、及び56℃にて30分間熱処理を行った。このサンプルを用い、前述した方法に従いOCIF活性を測定した。結果を表2に示す。

【0024】

【表2】

OCIFの熱安定性

希釈率	1/300	1/900	1/2700
未処理	++	+	-
70℃10分	+	-	-
56℃30分	+	-	-
90℃10分	-	-	-

【表中、++、+、-の意味については表1参照】

【0025】

(5) 内部アミノ酸配列の決定

ブルー5PWフラクション51～70について、2フラクションづつ各フラクション1mlに10 μ lの25%TFAを加えた後、25%アセトニトリル/0.1%TFAで平衡化した逆相カラム(BU-300, C4, 2.1 \times 220mm、アプライド社製)にかけ、60分間でアセトニトリルを55%にする直線

勾配、流速0.2 ml/分にて溶出を行い、ピーク6とピーク7を集めた。得られたピーク6とピーク7について、それぞれプロテインシーケンサー（プロサイス、494型、アプライド社製）を用い、N末端アミノ酸配列分析を行ったが、分析不能でありこれらの蛋白質につきN末端はブロックされている可能性が示唆された。そこで、これらの蛋白質の内部アミノ酸配列を解析した。即ち、ピーク6とピーク7のそれぞれを遠心濃縮した後、それぞれに100 μ gのジチオスレイトールを含む50 μ lの0.5M Tris-HCl, pH 8.5/10mM EDTA/7M 塩酸グアニジン/1% CHAPSを加えて室温で4時間放置し還元した後、0.2 μ lの4-ビニルピリジンを加え、室温暗所で一晩放置しピリジリエチル化した。これらのサンプルに1 μ lの25% TFAを加え、20% アセトニトリル/0.1% TFAで平衡化した逆相カラム（BU-300, C4, 2.1 \times 30 mm, アプライド社製）にかけ、30分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.3 ml/分で溶出を行い、還元ピリジリエチル化サンプルを得た。還元ピリジリエチル化したサンプルのそれぞれを遠心濃縮し、25 μ lの0.1M Tris-HCl, pH 9/8M 尿素/0.1% Tween 80で溶解した後、73 μ lの0.1M Tris-HCl, pH 9で希釈し、0.02 μ gのAP1（リシルエンドプロテアーゼ、和光純薬社製）を加え、37℃で15時間反応させた。反応液に1 μ lの25% TFAを加え、0.1% TFAで平衡化した逆相カラム（RP-300, C8, 2.1 \times 220 mm, アプライド社製）にかけ、70分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.2 ml/分で溶出を行い、ペプチドフラグメントを得た（図5）。得られたペプチドフラグメント（P1～P2）について、プロテインシーケンサーを用いアミノ酸配列分析を行った。結果を配列表配列番号1～2に示す。

【0026】

【発明の効果】

本発明により、新規な破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質及びその効率的な製造方法が提供される。本発明の蛋白質は破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤として或いはこれらの疾患の免疫学的診断の

ための抗原等として有用である。

【0027】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド（蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Tyr His Phe Pro Lys

1 5

【0028】

配列番号：2

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド（蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Gln His Ser Xaa Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Xaa Lys

1 Q H S 5 Q E Q T F Q L K



【図面の簡単な説明】

【図1】

Hi Load-Q/FF非吸着画分粗精製製品（試料3）をHi Load-S/HPカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図2】

ヘパリン-5PW粗精製製品（試料5）をブルー-5PWカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図3】

ブルー-5PW溶出フラクション49～50を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

【図4】

最終精製製品の還元条件下と非還元条件下におけるSDS-PAGEの結果を示す。

【符号の説明】

レーン1、4；分子量マーカー

レーン2、5；ピーク6

レーン3、6；ピーク7

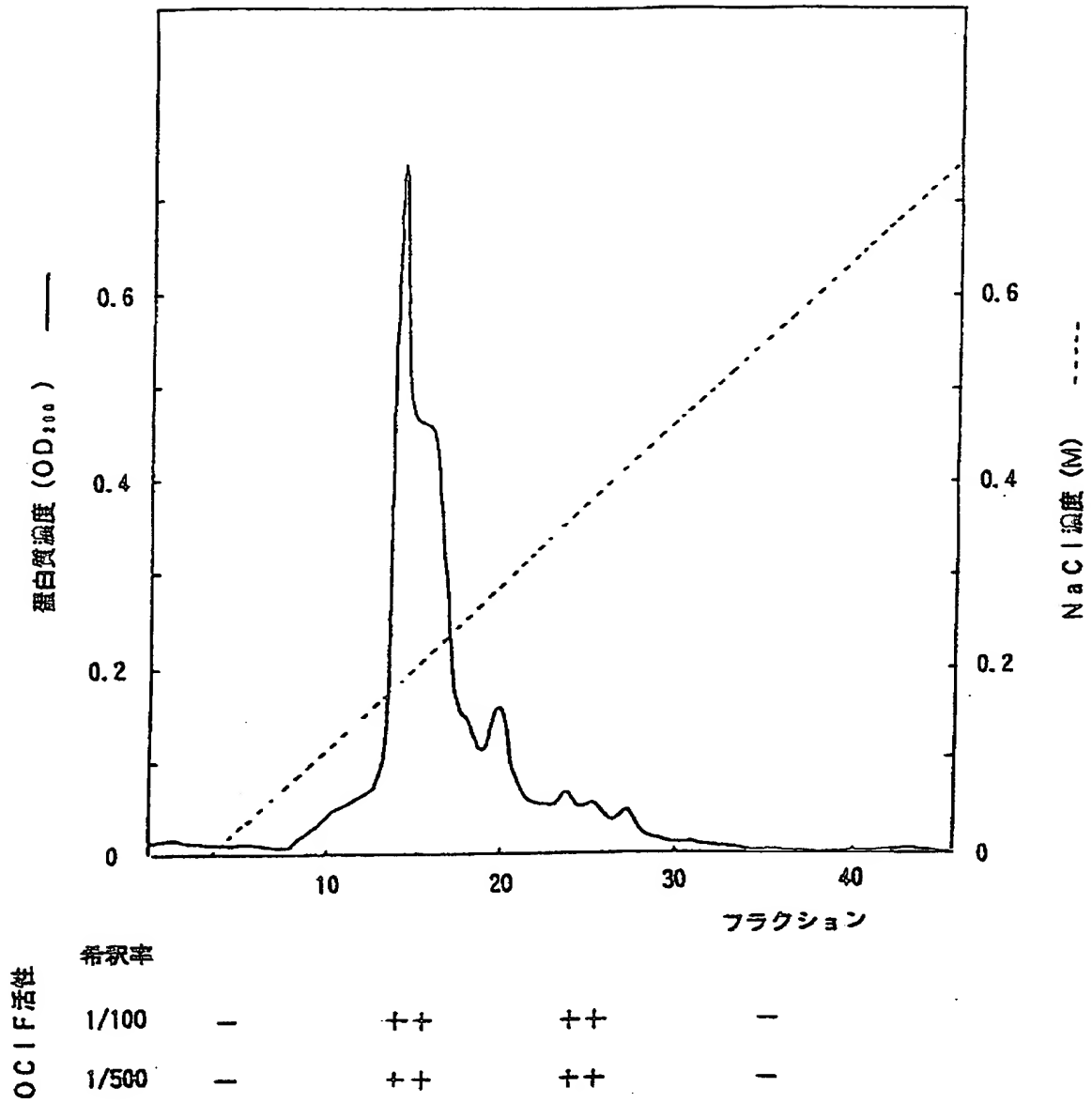
【図5】

還元ピリジリエチル化後、リシルエンドプロテアーゼ処理したピーク7を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

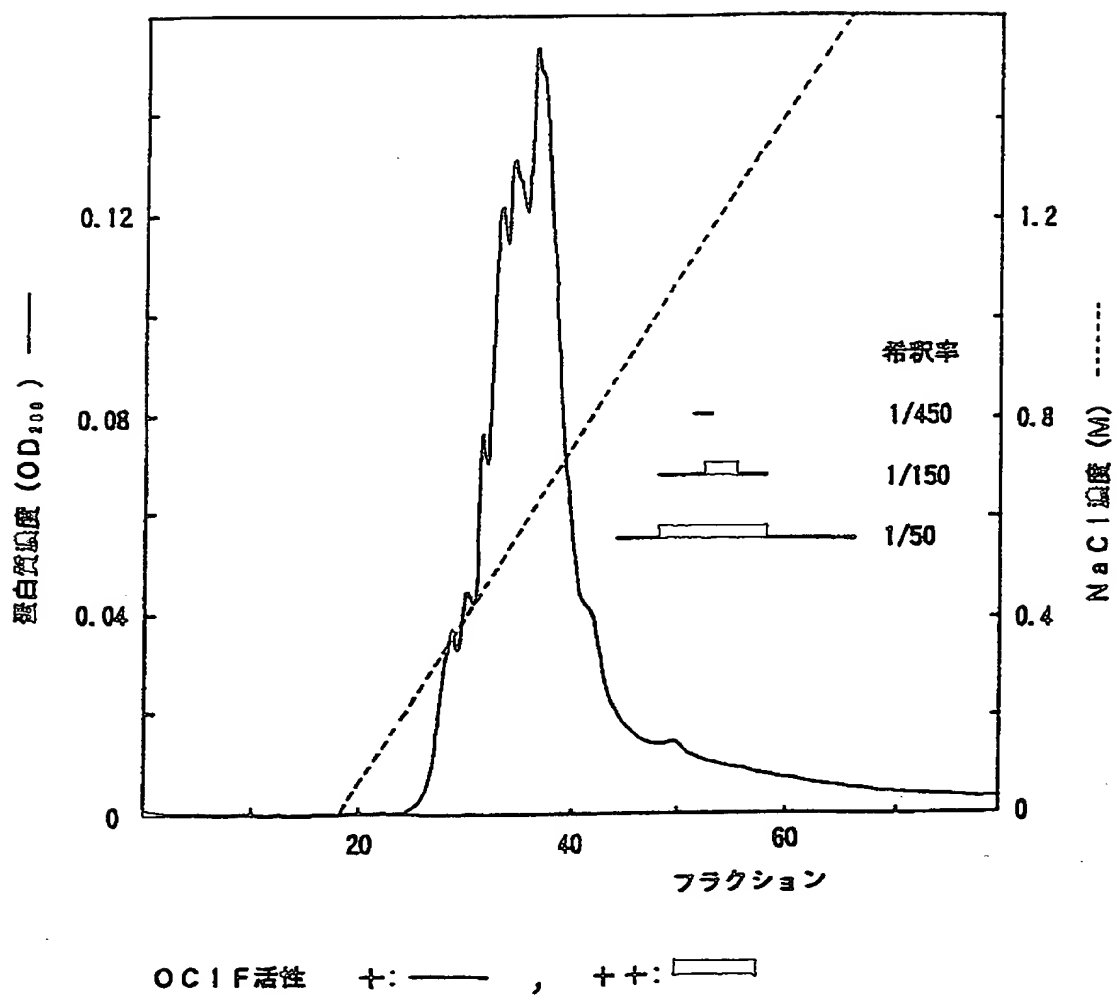
【書類名】

図面

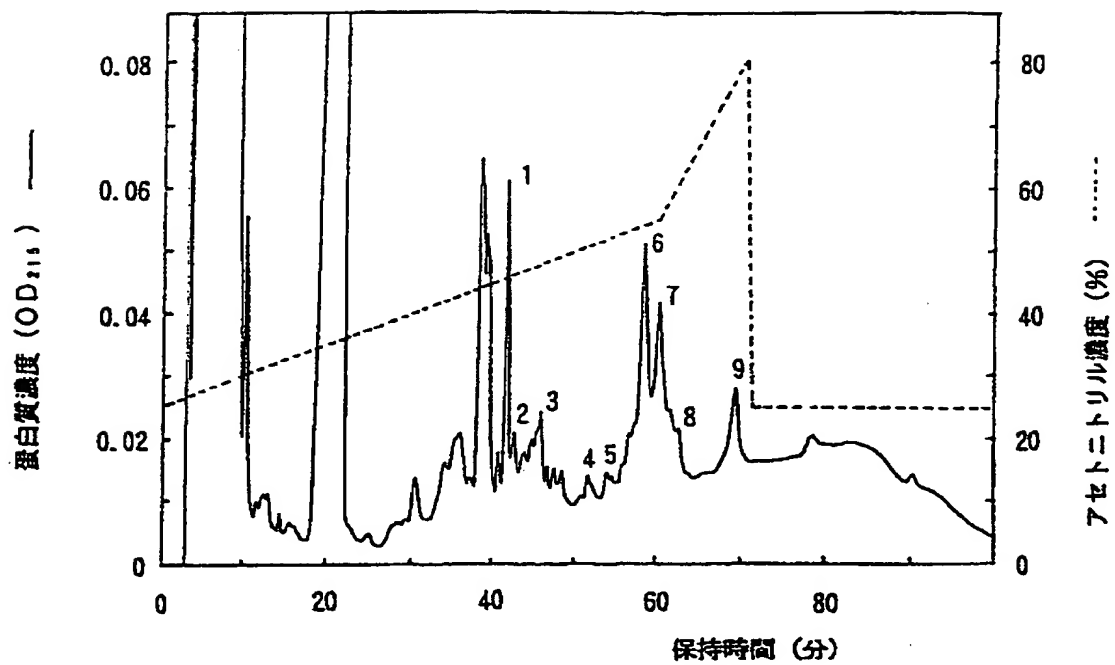
【図1】



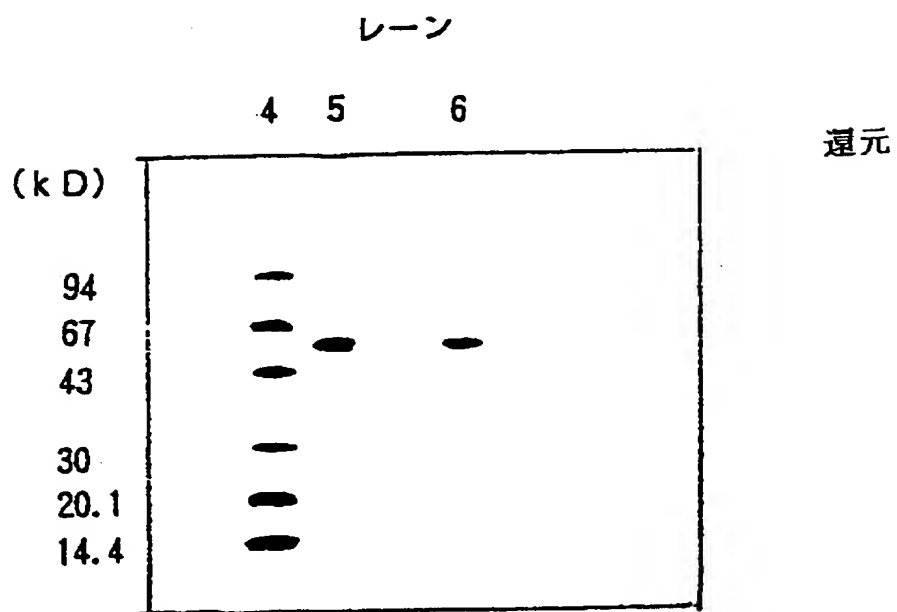
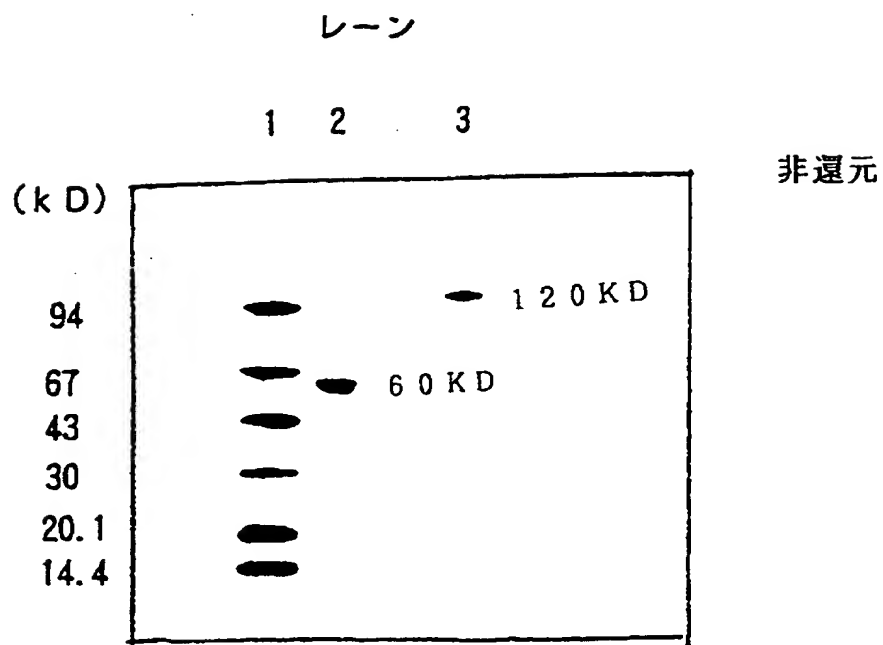
【図2】



【図3】

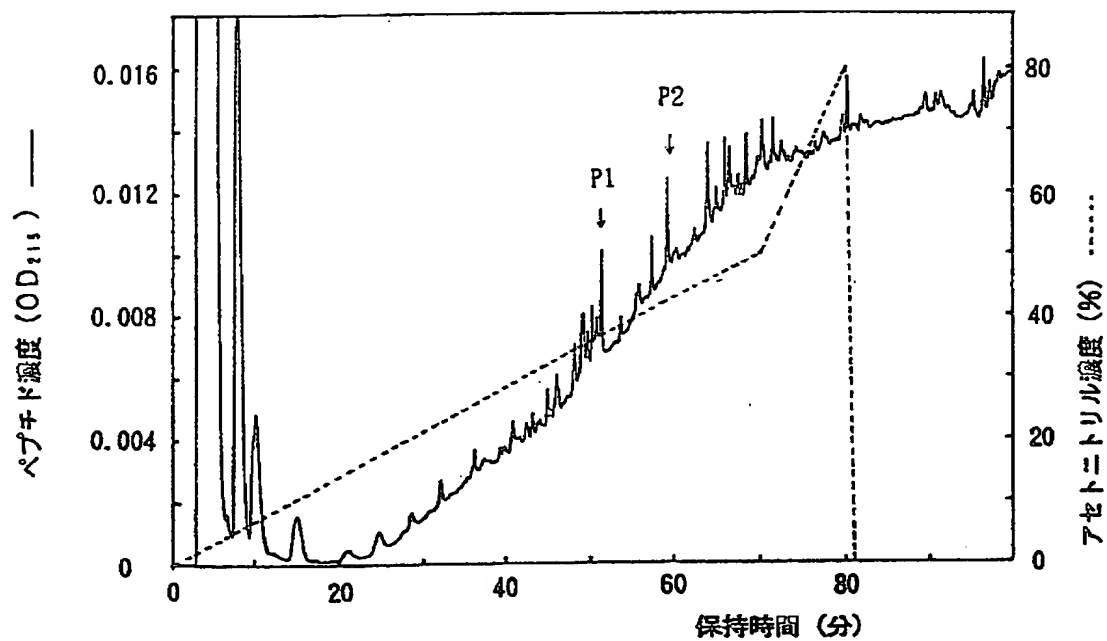


【図4】





【図5】





【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 次の物理化学的性質をもつ破骨細胞の分化・成熟抑制活性のある蛋白質。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60 kD (還元条件下)、約60 kD及び約120 kD (非還元条件下)

(b) 親和性 ; 陽イオン交換体、シバクロンブルー及びヘパリンに対して親和性を示す。

(c) 熱安定性 ; 70℃、10分間または56℃、30分間の熱処理により活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により活性が失われる。

(d) アミノ酸配列 ; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1及び配列番号2のアミノ酸配列をもつ。

ヒト線維芽細胞の培養液をイオン交換カラム、ヘパリンカラム、シバクロンブルーカラム及び逆相カラムで処理して吸着及び溶出をくり返して精製を行なう破骨細胞形成抑制蛋白質の製造法。

【効果】 骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤あるいは生化学的試薬として有用である。

【選択図】 なし



特平 7-054977



【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000006699

【住所又は居所】

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

【氏名又は名称】

雪印乳業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100090941

【住所又は居所】

東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階

藤野・児玉特許事務所

【氏名又は名称】

藤野 清也

【代理人】

申請人

【識別番号】

100105061

【住所又は居所】

東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階

藤野・児玉特許事務所

【氏名又は名称】

児玉 喜博

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
氏 名	雪印乳業株式会社